¿Qué es la vida?

"*La vida es una gran trampa lingüística: se utiliza como si fuera un nombre, pero sería más adecuado considerarla como un verbo.*" **Lynn Margulis**, en "Darwin era lamarckista".

"*La vida es algo que absorbe energía y la convierte en estructura, en orden, en organización.*" **John Gribbin,** en Redes 256 (*Dios no juega a los dados*).

"*Lo más importante es que la célula viva no es una materia mágica sino un superordenador. Se trata de un sistema de procesamiento y reproducción de información tan avanzado que nuestros ordenadores resultan patéticos en comparación. La naturaleza ha producido una máquina de procesamiento de información inigualable: la célula viva.*" **Paul Davis,** en Redes 359 (*Vida extraterrestre*).

"*Realmente somos un caldo de genes, que están en la población, y cada uno de nosotros es sólo un contenedor temporal de esos genes. En el marco histórico el individuo no es importante, los genes son los que continúan.*" **David Bainbridge,** en Redes 328 (*Vivir en el útero de la madre*).

"*[...] un ingeniero, familiarizado solamente con máquinas de vapor, estará preparado, después de examinar la construcción de un motor eléctrico, para descubrir que éste funciona basado en principios que él todavía no entiende. Él ve el cobre, que le es familiar por su uso en calderas, usado aquí bajo forma de largos hilos enrollados formando bobinas; el hierro, que le es familiar en palancas, barras y cilindros de máquinas de vapor, usado aquí para ocupar el interior de esas bobinas de alambre. Quedará convencido de que se trata del mismo cobre y el mismo hierro, sujetos a las mismas leyes de la Naturaleza y, en esto, tendrá razón. La diferencia en la construcción es suficiente para que estos materiales funcionen de manera diferente. Este ingeniero no pensará que el motor eléctrico funciona dirigido por un fantasma, sólo porque comienza a girar cuando se acciona un interruptor, sin precisar una hornalla o vapor.*" **Erwin Schrödinger**, What is Life? With Mind and Matter with Autobiographical Sketches. Cambridge, Cambridge University Press, 1992.

Definición biológica

Dada la confusión a la hora de definir vida, se optó por definirla en función a los resultados que se obtienen tras el desarrollo completo del ADN, y no en base al potencial mismo de esa molécula, así se establecieron algunas características comunes:

1. Los seres vivos requieren energía. Es decir, se alimentan.
2. Los seres vivos crecen y se desarrollan.
3. Los seres vivos responden a su medio ambiente.
4. Los seres vivos se reproducen por sí mismos. Sin necesitar ayuda externa. Siendo éste un hecho clave.

Definición fisiológica

Un organismo vivo es aquel, compuesto por materia orgánica (C,H,O,N,S,P), capaz de llevar a cabo funciones tales como comer, metabolizar, excretar, respirar, moverse, crecer, reproducirse y responder a estímulos externos.

Definición metabólica

Un sistema vivo es un objeto con una frontera definida que continuamente intercambia sustancias con el medio circundante sin alterarse.

Definición bioquímica

Todo organismo vivo contiene información hereditaria reproducible codificada en los ácidos nucleicos los cuales controlan el metabolismo celular a través de unas moléculas (proteínas) llamadas enzimas que catalizan o inhiben las diferentes reacciones biológicas.

Definición genética

La vida es todo sistema capaz de evolucionar por selección natural.

Definición termodinámica

Los sistemas vivos son regiones localizadas donde se produce un continuo incremento de orden sin intervención externa.

Especulaciones recientes

VIDA ES UN ESTADO DE LA ENERGÍA CUÁNTICA EN ALGUNOS SISTEMAS TERMODINÁMICOS CUASI-ESTABLES QUE DETERMINA UNA SERIE DE INTERVALOS QUE DEMORAN SU DIFUSIÓN O DISPERSIÓN ESPONTÁNEA HACIA MÁS MICROESTADOS POTENCIALES.

Existe una teoría final, la cual para algunos es la conclusión definitiva de vida, que está basada en la segunda Ley de la Termodinámica, la cual dice que el universo siempre incrementa su entropía o desorden. Esta teoría dice que los sistemas vivos «son regiones localizadas donde se produce un continuo incremento de orden sin intervención externa» Tal vez sea la más segura en estos momentos para definir qué es la vida. O tal vez debamos cambiar nuestro concepto del universo en una forma radical.

FLORA HABITUAL

Nuestros cuerpos alojan normalmente gran número de microorganismos diversos, especialmente bacterias.
Se ha estimado que la cantidad de microorganismos comensales llega en promedio a 10^{14}. Estos microorganismos comensales que no producen enfermedad se denomina Flora normal del Organismo, y habitan en piel, cavidades en contacto con la superficie, y tracto gastrointestinal. La composición de la flora normal, varía de un individuo a otro. Algunos miembros de la flora normal pueden transformarse en patógenos si se alteran las condiciones fisiológicas del individuo, se altera la virulencia del organismo o se introducen en localizaciones estériles. La flora normal es beneficiosa ya que impide la colonización por otros microorganismos patógenos, y producen algunos nutrientes esenciales para el organismo (Ej: Vitamina K es producida por la flora del intestino).

Flora Normal de Piel:
Staphylooccus epidermidis o coag(-)
Staphylococcus aureus
Diphteroides
Coynebacterium sp.
Propionibacterium

Flora Normal de Boca y Garganta:

Streptococcus mitis y *salivarius*
Diphteroides
Anaerobios (*Fusobacterium*)
Staphylococcus epidermidis o coag (-)
Espiroquetas

Flora Normal de Nasofaringe:
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus aureus
Streptococcus pneumoniae y *pyogenes*
Hemophylus
Neisseriae

Flora Normal del Estómago:
Usualmente estéril pero se puede encontrar
Campylobacter jejuni
Helycobacter pylori

Flora Normal de Intestino Delgado:
Lactobacilus
Anaerobios Gran negativos
Enterococcus
Enterobacteriáceas
Mycobacteria

Flora Normal del Intestino Grueso:
Anaerobios estrictos: *Bacteroides sp*. : cocos
Gram negativos anerobios, *Clostridium*.
Enterobacteriáceas (*E.coli*)
Enterococos

Flora Normal Tracto Urogenital:
Ambos Sexos: Flora de piel en uretra distal

Mujeres Adultas Vagina:

Lactobacilli
Diphteroides
Anaerobios
Levaduras (*Candida sp*.)

Reactivos para Microbiología: Colorantes

Azul de metileno (de Loeffler para tinciones simples)

Compuesto	Cantidad
Solución de Hidróxido potásico al 1 %	1 mL
Azul de metileno, sol. Saturada, en etanol de 95 %	30 mL
Agua destilada	100 mL

Safranina (para tinción de Gram)

Compuesto	Cantidad
Safranina	0,25 g
Agua destilada	100 mL

Lugol (para tinción de Gram)

Compuesto	Cantidad
Yodo	0,33 g
Yoduro potásico	0,66 g
Agua destilada	100 mL

Violeta cristal (para tinción de Gram)

Compuesto	Cantidad
Violeta cristal (Violeta de genciana)	0,5g
Agua destilada	100 mL

Fucsina básica (para tinción de Gram)

Compuesto	Cantidad
Fucsina fenicada	6,6 mL
Agua destilada	100 mL

Fucsina fenicada (para tinción ácido-resistente)

Compuesto	Cantidad
Fucsina básica	1 g
Etanol al 95 %	10 mL
Fenol, al 5 % en solución acuosa	100 mL

Verde de malaquita (para tinción de filtros de membrana)

Compuesto	Cantidad
Verde malaquita	1 g
Agua destilada	100 mL

Reactivos para Microbiología: Desinfectantes

Solución de hipoclorito (para inmersión)

Compuesto	Cantidad
Lejía comercial	**0,5 a 1 mL**
Agua destilada	**100 mL**

Solución de fenol (para aspersión)

Compuesto	Cantidad
Fenol	**1 g**
Agua destilada	**100 mL**

Reactivos para Microbiología: Pruebas Bioquímicas

Rojo de Metilo

Compuesto	Cantidad
Rojo de metilo	**0,02 g**
Etanol al 95 %	**60 mL**
Agua destilada	**100 mL**

Reactivo para el Indol

Compuesto	Cantidad
***p*-Dimetilaminobenzaldehído**	**1 g**
Alcohol amílico (o isoamílico)	**15 mL**
Ácido clorhídrico c.c.	**5 mL**

Se disuelve el aldehído en el alcohol en baño de agua a 60 ºC, se enfría y se añade el ácido gota a gota. Se conserva en refrigerador.

Reactivo Kovacs (para la oxidasa)

Compuesto	Cantidad
Cloruro de tetrametil-*p*-fenilendiamina	**0,1 g**
Agua destilada	**10 mL**
Ácido ascórbico (como antioxidante)	**0,01 g**

Se conserva en frasco oscuro y en refrigerador.

Reactivo A de Barrit (para la prueba de Voges-Proskauer)

Compuesto	Cantidad
Hidróxido potásico	**16 g**
Agua	**100 mL**

Reactivo B de Barrit (para la prueba de Voges-Proskauer)

Compuesto	Cantidad
α-naftol	**6 g**
Etanol al 95 %	**100 mL**

Reactivo de potasa (para la prueba de emulsión)

Compuesto	Cantidad
Hidróxido potásico	**3 g**
Agua	**100 mL**

Reactivo de agua oxigenada (para la prueba de la catalasa)

Compuesto	Cantidad
Agua oxigenada concentrada	**9,1 mL**
Agua	**100 mL**

Medios de Cultivo y afines para Microbiología

Medio VPRM (caldo de Clark y Lubs para los ensayos de RM y V-P)

Compuesto	Cantidad
Peptona	**7 g**
Dextrosa	**5 g**
Fosfato potásico	**5 g**

pH del medio apunto de uso 7,0 aproximadamente.

Solución yodo-yodurada (según AOAC para el caldo tetrationato bilis verde brillante)

Compuesto	Cantidad
Yodo	**6 g**
Yoduro potásico	**5 g**
Agua destilada	**20 mL**

Solución yodo-yodurada (según B.O.E. para el caldo tetrationato bilis verde brillante)

Compuesto	Cantidad
Yodo	**4 g**
Yoduro potásico	**5 g**
Agua destilada	**20 mL**

Medios de cultivo deshidratados: agares

NOMBRE USUAL	SIGLA	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
Recuento en placa	PCA	Nutritivo	
Levine	EMB	Eosina azul de metileno	
Endo			
Citrato de Simmons		Agar medio de Koser	
Klinger	KIA		Alternativa a TSI
Rojo bilis violeta glucosa	VRBG		Alternativo a McConkey
Rojo bilis violeta lactosa	VRBL		Alternativo a McConkey
Sulfito polimixina sulfadiacida	SPS		Alternativa a Wilson-Blair
Urea		Christensen	Aparte urea al 40 %
Hecktoen			No autoclavar
Verde brillante	BGA		
Baird-Parker	B-P		Aparte yema huevo telurito
Sabouraud CeNAM			Aparte oxitetraciclina
Cetrimida		Pseudomona base	

Medios de cultivo deshidratados: caldos

NOMBRE USUAL	SIGLA	OTROS NOMBRES	OBSERVACIONES
Agua de peptona	PW		
Agua de peptona tamponada	BPW		
Agua de triptona	TW	Peptona	
Caldo lactosado	LB		
Caldo enterobacterias	E.C.		
Caldo biliado lactosado al verde brillante	BGBL		
Caldo etil violeta azida	EVA	Litsky	
Caldo Glucosa azida		Rothe	
Caldo tetrationato bilis verde brillante			Aparte solución yodo/yodurada
Caldo selenito verde brillante sulfamida			Alternativo a selenito cistina
Caldo lisina descarboxilasa		Taylor	

MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS PARA AGARES

Agar polvo	**A-1**
Baird-Parker (BP)	**A-2**
Verde brillante (BGA)	**A-3**
Cetrimide	**A-4**
Citrato de Simmons	**A-5**
Rosa de bengala con cloranfenicol	**A-6**
Desoxicolato-citrato (Hynes)	**A-7**
ENDO (Membranas Millipore – Enterobacteriaceae)	**A-8**
Glucosa bilis rojo bioleta (VRBG)	**A-9**
Hecktoen	**A-10**
Hierro sulfito	**A-11**
Klinger (KIA)	**A-12**
Eosina azul de metileno (EMB) o Levine	**A-13**
M-Enteroccocus Slatnez-Bartley (TTC)	**A-14**
Nutritivo (PCA)	**A-15**
Saboureaud CeNAN	**A-16**
Sulfito polimixina sulfadiazina (SPS)	**A-17**
Tres azúcares hierro (TSI)	**A-18**
Urea base (Christensen)	**A-19**
M-coliformes fecales (M-FC)	**A-20**

MEDIOS DE CULTIVOS DESHIDRATADOS PARA CALDOS

Azida de Rothe	**C-1**
E.C. bouillón	**C-2**
Etil violeta azida (Litsky)	**C-3**
Lactosado biliado verde brillante al 2 % (BGBL)	**C-4**
Lisina descarboxilasa (Taylor)	**C-5**
Lactosado (LB)	**C-6**
Nutritivo	**C-7**
Selenito verde brillante sulfamida (CS)	**C-8**
Tetrationato bilis verde brillante (CT o de Mueller-Kaufmann)	**C-9**
Triptosa soja (TSB)	**C-10**

MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS PARA DILUYENTES

Agua de peptona (PW)	**W-1**
Agua de triptona (TW)	**W-2**
Agua de peptona tamponada (BPW)	**W-3**
Suero fisiológico	**L-1**

REACTIVOS Y COLORANTES

D(+)-Glucosa (dextrosa)	**R-1**
Fenol	**R-2**
(4)*p*-Dimetilaminobenzaldehido (Reactivo de Kovacs para el indol)	**R-3**
Extracto de levadura	**R-4**
NaCl (cloruro de sodio)	**R-5**
KH2PO4 (dihidrógenofosfato de potasio)	**R-6**
Safranina	**R-7**
Lactosa	**R-8**
Violeta cristal	**R-9**
Fucsina	**R-10**
Verde de malaquita	**R-11**
Azul de metileno	**R-12**

REACTIVOS EN FRIGORÍFICO

Emulsión yema de huevo telurito	**F-1**
Oxitetraciclina	**F-2**
Tetraciclina	**F-3**
Urea solución al 40 %	**F-4**
N,N-Tetrametil-*p*-fenilendiamina (Reactivo de la Oxidasa)	**F-5**

E.M.B. Agar.

Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobacteriaceae.

Fundamento

Este medio combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de Escherichia coli y Citrobacter spp. presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras. Este medio permite el crecimiento de Candida spp. como colonias rosadas y puntiformes; la siembra en profundidad permite el desarrollo de clamidosporas en C. albicans. Enterococcus spp. crece en este medio como colonias puntiformes y transparentes, mientras que Acinetobacter spp. y otras bacterias oxidativas pueden dar colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0.5% y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene además, un buen desarrollo de especies de Salmonella y Shigella.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	10.0	Suspender 36 g del polvo en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos; mezclar, calentando a ebullición durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a no más de 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°C y distribuir agitando suavemente.
Lactosa	5.0	
Sacarosa	5.0	
Fosfato dipotásico	2.0	
Agar	13.5	
Eosina	0.4	
Azul de metileno	0.065	
pH final: 7.2 ± 0.2		

Siembra

En superficie, por estriado a partir de un inóculo poco denso, para obtener colonias aisladas.
En profundidad, para favorecer el desarrollo de clamidosporas.

Incubación

De 24 a 48 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

Resultados

Microorganismos	Tipo de Colonia
Escherichia coli ATCC 25922	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Mucosas, rosa púrpura, confluentes
Proteus mirabilis ATCC 43071	Incoloras
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Incoloras, pequeñas, puntiformes
Shigella flexneri ATCC 12022	Incoloras
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Incoloras

Características del medio:

Placas preparadas: color púrpura.

La esterilización del medio de cultivo reduce el azul de metileno al color naranja. El color púrpura se restaura por agitación. La presencia de un precipitado en el medio esterilizado es normal y no debe ser removido, ya que es parte esencial del mismo.

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 ºC.
Medio preparado: a 2-8 ºC.

Presentación		
x 100g :Código: B02-101-05	x 500g :Código: B02-101-06	6 x 50 ml: B04-101-84

http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/embagar.htm

Valores del NMP para 3 tubos inoculados con cada una de tres diluciones decimales sucesivas				
Número de tubos positivos observados en cada dilución			**NMP de microorganismos por mL de la primera dilución**	**Categoría***
1ª dilución	**2ª dilución**	**3ª dilución**		
0	**0**	**0**	**0**	**-**
0	**0**	**1**	**0,3**	**3**
0	**1**	**0**	**0,3**	**2**
0	**1**	**1**	**0,6**	**4**
0	**2**	**0**	**0,6**	**4**
1	**0**	**0**	**0,4**	**1**
1	**0**	**1**	**0,7**	**3**
1	**0**	**2**	**1,1**	**4**
1	**1**	**0**	**0,7**	**2**
1	**0**	**1**	**1,1**	**4**
1	**2**	**0**	**1,1**	**3**
1	**2**	**1**	**1,5**	**4**
1	**3**	**0**	**1,6**	**4**
2	**0**	**0**	**0,9**	**1**
2	**0**	**1**	**1,4**	**3**
2	**0**	**2**	**2,0**	**4**
2	**1**	**0**	**1,5**	**2**
2	**1**	**1**	**2,0**	**4**
2	**1**	**2**	**3,0**	**4**
2	**2**	**0**	**2,0**	**3**
2	**2**	**1**	**3,0**	**4**
2	**2**	**2**	**3,5**	**4**
2	**2**	**3**	**4,0**	**4**
2	**3**	**0**	**3,0**	**4**
2	**3**	**1**	**3,5**	**4**
2	**3**	**1**	**4,0**	**4**
3	**0**	**2**	**2,5**	**1**
3	**0**	**3**	**4,0**	**2**
3	**0**	**0**	**6,5**	**4**
3	**1**	**1**	**4,5**	**1**
3	**1**	**1**	**7,5**	**2**
3	**1**	**2**	**11,5**	**3**
3	**1**	**3**	**16,0**	**4**
3	**2**	**0**	**9,0**	**1**
3	**2**	**1**	**15,0**	**2**
3	**2**	**2**	**20,0**	**3**
3	**2**	**3**	**30,0**	**4**
3	**3**	**0**	**25,0**	**1**
3	**3**	**1**	**45,0**	**1**
3	**3**	**2**	**110,0**	**1**
3	**3**	**3**	**> 140,0**	**-**

Los límites de confianza aproximados al 95 % pueden calcularse de la siguiente forma:

$$\frac{NMP}{4{,}68} \; aNMP \cdot 4{,}68$$

*** Realmente las combinaciones de la Categoría 1 puede esperarse que alcancen el 67,5 % de los resultados que contienen los tubos positivos y negativos; las Categorías (1+2) el 91 % y las categorías (1+2+3) el 99 % de los resultados. La Categoría 4 y las combinaciones que no figuran son muy improbables.**

USO DE CRIOTECA

CRIOTECA

Una crioteca no es más que un conjunto de viales diseñados para facilitar la inoculación, manipulación y conservación de cepas microbianas.

Cada vial contiene unos 25 aros de vidrio poroso, químicamente tratados para mejorar la adherencia microbiana, y líquido criogénico.

Existen 5 tipos de criotecas.

1. Clásica (general).
2. Levaduras y mohos.
3. Marina.
4. Skim Milk (m.o. difíciles).
5. Anaerotecas (anaerobios).

MODO DE EMPLEO

OBTENCIÓN

1. Introduzca una suspensión espesa de cultivo o una colonia en el vial. Idealmente se debe partir de cultivos frescos (18-14 h de vida) en Agar Sangre, TSA, BHI o TSB para bacterias, y en SDA, SDB o YMB par hongos, incubados a 35 ºC. En caso de utilizar caldos, es preferible centrifugar, decantar la zona menos espesa y utilizar el fondo.
2. Voltee el vial cerrado 10 veces para que cada aro se impregne bien de caldo y espere un minuto.
3. Elimine todo el líquido que sea posible con una jeringa estéril.
4. Vuelva a cerrar el vial y marque con rotulador indeleble. Colóquelo horizontal sobre la mesa y de unos golpes secos sobre la mesa para que los aros se repartan a los largo del criovial para hacerlos más accesibles.
5. Congele el vial entre -20 y -60 ºC.

RECUPERACIÓN

1. Extraiga el vial del congelador y con golpes secos separe los aros.
2. Extraiga un aro con un palillo estéril.
3. Haga rodar el aro sobre un agar no selectivo como si realizase un agotamiento en estrías. Si la cepa fuera de crecimiento difícil, es preferible incubarlo previamente en un caldo de cultivo general antes de pasarlo a la placa. Si la cepa es de crecimiento fácil el cado de cultivo general incubado puede utilizarse directamente como fuente de la cepa.
4. Destruya por esterilización tanto el palillo como el aro una vez utilizado y nunca lo devuelva al vial.

PRECAUCIONES

1. Como medida preventiva realice siempre duplicados.
2. Después de usarlo no permita que el vial se atempere y guárdelo inmediatamente en el congelador.
3. Utilice siempre técnicas asépticas.
4. Extreme las precauciones al trabajar con m.o. peligrosos.
5. Observa las precauciones habituales en el desecho de material contaminado.

USO DE BBL ENTERORUBE I I

BBL ENTEROTUBE II

El BBl Enterotube II es un sistemas de análisis listo para su uso, para un identificación racional y segura de Enterobacteriaceae.

El tubo de plástico compartimentado en 13 zonas permite la detección simultanea de 15 propiedades bioquímicas diferentes.

Todos los compartimentos se inoculan al mismo tiempo y en una sola operación, y se evalúan después de una incubación entre 35 y 37 ºC y durante 20 – 24 horas.

El sistema de identificación es por codificación computerizada (SICC).

Es imprescindible disponer de colonias individuales aislada de bacterias de Enterobacteriaceae que sean por tanto Gram (-) y Citocromooxidasa (-), para cuya obtención se suelen utilizar diferentes medios: Agar McConkey, Agar Endo, EMB, Agar Hecktoen, Agar Salmonella-Shigella y VRBG entre otros.

PROCEDIMIENTO

1. Quitar los capuchones de protección roscados. Bajo el blanco se encuentra la punta de la aguja de inoculación ya estéril.
2. Con dicha punta toca una colonia perfectamente aislada y sin tocar el agar.
3. Pasa la aguja de inoculación por todos los compartimentos haciéndola girar ligeramente.
4. Introduce de nuevo la aguja hasta que la muesca de la aguja alcance la abertura del tubo (la punta de la aguja debe llegar hasta el compartimento del citrato).
5. Rompe la aguja doblándola por la muesca. La parte que queda dentro garantiza la incubación anaerobia de los compartimentos parafinados (glucosa, lisina y ornitina, así como la producción de gas de la glucosa).
6. Con el extremo restante de la aguja rota perfora la película plástica que recubre los orificios de aireación de los últimos 8 compartimentos (adonitol, lactosa arabinosa, sorbitol, Voges-Proskauer, dulcitol/fenilalanina, urea y citrato) para permitir el crecimiento en aerobiosis.
7. Enrosca de nuevo los dos capuchones.
8. Incuba preferentemente en posición vertical con el compartimento de la glucosa (tapón roscado azul) para arriba, o también en posición horizontal, con la película de plástico hacia abajo, durante 20-24 horas a 25-37 ºC.
9. Registrar los resultados según el patrón o por comparación con uno no inoculado. La reacción será considerada como negativa cuando no haya sufrido alteración alguna, excepto en las pruebas de Voges- Proskauer e Indol. Para el indol se mantiene con la superficie plana hacia arriba y se añade con una jeringa 3 o 4 gotas de reactivo de Kovacs atravesando la película plástica del compartimento sulfuro de hidrógeno/indol, caso de ser positivo se debe enrojecer en pocos segundos. Para la prueba de Voges-Proskauer se inyectan 3 gotas de gotas de a-naftol y dos gotas de potasa por el orificio de aireación lateral en su compartimento. El reactivo agregado debe adquirir color rojo dentro de los 10 primeros minutos.
10. Suma, en función de los resultado obtenidos, los puntos según el patrón de evaluación hasta obtener un código de 5 dígitos que representa un biocódigo comparable con el de ***Becton Dickinson Microbiology Systems***.

DESARROLLO EN BGA

MICROORGANISMO	DESARROLLO	COLOR COLONIA	COLOR MEDIO
E. Coli	-/+	Amarillo-verde	Amarillo-verde
Salmonella enteriditis	++	Rosa-blanco	Rojo
Salmonella typhy	-/+	Rojo	Rojo
Salmonella typhimorium	++	Rosa-blanco	Rojo
St. aureus	-/+	Amarillo	Amarillo

DESARROLLO EN HECKTOEN

MICROORGANISMO	DESARROLLO	COLOR COLONIA
Enterobacter cloacae	+	Naranja
E. coli	+	Naranja
Salmonella enteriditis	++	Azul-verdoso centro negro
Salmonella typhimorium	++	Azul-verdoso centro negro
Shigella flexneri	++	Azul-verdoso
Enterococcus faecalis	-	-

DESARROLLO EN EMB

MICROORGANISMO	DESARROLLO	COLOR COLONIA
Enterobacter aerogenes	++	Rosa
E. coli	++	Púrpura-violeta con o sin brillo metálico verdoso
Pseudomonas aeruginosa	+	Incolora
Salmonella typhimorium	++	incolora
St. aureus	-	-

DESARROLLO EN BP-A

MICROORGANISMO	DESARROLLO	COLOR COLONIA
Proteus mirábilis ATC 25933	++	Marrón
E. coli ATCC 25922	-	-
St. eidermis ATCC 25923	+	Negra
St. aureus ATCC	++	Negra con halos de lecitinasas